

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ПРОМЫВНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

В.И. Ковальчук¹, А.В. Глуткин¹, В.У. Бука², П.П. Воронов², В.Л. Мороз², Т.В. Ковальчук

¹Гродненский государственный медицинский университет

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Гродно

Введение. Термические поражения кожи представляют собой серьезную медицинскую, социальную и экономическую проблему и занимают третье место в структуре травматизма мирного времени. Несмотря на большие успехи, достигнутые в лечении ожогов, летальность среди обожженных больных остается высокой даже в специализированных стационарах. Одной из главных причин высокой летальности среди пострадавших является полиорганная недостаточность, разви-

вающаяся вследствие системного воспалительного ответа. Зная тяжесть термических повреждений необходимо рассматривать данное состояние как иммунодефицитное заболевание, при котором отмечается раннее и продолжительное снижение показателей врожденного и приобретенного иммунитета [10,11]. Необходимо учитывать, что иммунный ответ у тяжелообожженных развивается на фоне большого числа иммуносупрессивных факторов: обширного повреждения кожи как иммунного органа, стресса во время травмы, воздействия огромного количества токсинов обожженных тканей, усиления перекисидации липидов и нарушения структуры мембранных систем клеток, воздействия антибиотикотерапии, гормонотерапии, острого дефицита энергетических и пластических ресурсов [6]. При тяжелых термических поражениях особенно угнетены клеточные механизмы защиты. Значительное угнетение Т- и В-систем иммунитета приводит к резкому снижению сопротивляемости организма к инфекционным агентам, что может стать предпосылкой для развития как местных, так и общих инфекционных осложнений, вплоть до ожогового сепсиса [7].

Материалы и методы. Иммунологические исследования проводили в промывной жидкости, полученной непосредственно из очага поражения у детей с ожоговой болезнью в объеме 10 мл физиологического раствора. Исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов [9] в нашей модификации, относительное количество лейкоцитов [4] и экспрессию лимфоцитарных антигенов с использованием моноклональных антител против CD3, CD4, CD8, CD19 [3], иммунорегуляторный индекс.

Для определения функциональной активности нейтрофилов отбирали 5 мл промывной жидкости, центрифугировали при 3 000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно убирали водоструйным насосом и клеточный осадок ресуспендировали. В лунки иммунологических планшет вносили равные объемы (50 мкл) клеточной суспензии и культуры стафилококка с титром 1 млрд. микробных тел/мл и инкубировали в термостате при 37⁰ С в течение 1 часа, после чего планшеты центрифугировали в течение 2 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок наносили на предметное стекло, фиксировали спиртом и окрашивали по Романовскому. Количественный учет реакции проводили микроскопически. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по фагоцитарному индексу (ФИ) – процент фагоцитов, содержащих поглощенные микробные тела относительно общего числа, и по фагоцитарному числу (ФЧ) – среднее число на один фагоцит. Для исследования экспрессии лимфоцитарных антигенов в очаге поражения промывную жидкость в объеме 5 мл центрифугировали при 3 000 об/мин. Надосадочную жидкость убирали водоструйным насосом. Осадок отмывали в физиологическом растворе, забуференном в ФСБ (фосфатно-солевой буфера), рН 7.2. Для обогащения клеточной суспензии лимфоцитами взвесь трижды отмывали этим же раствором в пробирках, и центрифугировали при 1000 об/мин 3 мин. Концентрация составляла 2–3 тыс/мкл. Примесь эритроцитов в промывной жидкости лизировали 0,87% раствором хлористого аммония, добавив его к осадку 10–кратный объем на 2–3 мин. Затем взвесь клеток двукратно отмывали физиологическим раствором в ФСБ и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 минут. В круглодонные лунки иммунологических планшет вносили по 25 мкл CD-диагностикума антител против CD3, CD4, CD8, CD19, CD25 антигенов лимфоцитов и добавляли равный объем клеточной суспензии. Смесь инкубировали в течение 25 мин при 37⁰ С с последующим центрифугированием при 1000 об/мин. в течение 2 минут и оставляли на ночь при +4⁰ С. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 25 мкл 0.12% раствора глутарового альдегида, осторожно ресуспендировали и наносили на предметное стекло. Сушили, фиксировали спиртом и окрашивали по Романовскому. Микроскопически подсчитывали процент антигенположительных лимфоцитов.

Результаты и их обсуждение. Контроль и оценка локального иммунного статуса имеет важное прогностическое и диагностическое значение при лечении термической травмы у детей. Среди множества факторов, обуславливающих возможности возникновения и определяющих течение хронического процесса, одним из основных является оценка состояния местных механизмов защиты. Известно, что низкая функциональная активность клеток иммунной системы не только общая, но и местная определяет длительность течения и хронизацию процесса при ожоговой болезни, которая протекает на фоне сниженных показателей фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов и существенных изменений популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов в очаге поражения [1,5].

Основным диагностическим критерием при термической травме является биопсия с места поражения с последующим морфо-гистологическим исследованием, которое позволяет оценить только клеточный состав и морфологию клеток и не даёт возможности провести функциональный анализ клеток и медиаторов воспаления в очаге [9]. Одним из возможных объективных критериев

качества лечения, по всей видимости, может являться изменение активности местных факторов и механизмов иммунитета. Ввиду этого нами был предложен способ определения функционирования клеток иммунной системы с ожоговой поверхности в промывной жидкости и исследованы в динамике показатели иммунного статуса и реактивности местных механизмов иммунитета в очаге поражения у детей с ожоговой болезнью различной степенью тяжести.

Оценка функционирования клеток иммунной системы в локальном очаге поражения имеет диагностическое значение: в группе больных детей с тяжелым течением ожоговой травмы отмечены выраженные изменения специфической и неспецифической иммунорезистентности в виде резкого снижения фагоцитарной активности нейтрофилов, лейкоцитоза и подавления экспрессии лимфоцитарных антигенов. Эти изменения приводят к снижению уровня элиминации клетками иммунной системы патогенной микрофлоры, усиление воспалительного процесса, затяжному течению термической травмы и пролонгации сроков регенерации.

Таким образом, проведение местной иммунодиагностики может служить основанием для прогнозирования течения, степени тяжести термической травмы, своевременного назначения иммунокорректирующей терапии при аутотрансплантации тканей.

Литература

1. Булгакова, А.И. Совершенствование местной терапии хронического генерализованного пародонтита: автореф. дис. канд. мед. наук. /А.И. Булгакова.– М. 1999. – 22 с.
2. Новиков, Д.К. «Медицинская иммунология» /Д.К. Новиков, 2005. – 304 с.
3. Лахтин, Ю.В. Определение количества лейкоцитов в оральных смывах / Ю.В. Лахтин // Лабораторное дело. 1990. – № 10. – С. 57–59.
4. Новиков, Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. 1996. – 282с.
5. Петров Р.В., Лопухин Ю.М, Чередеев А.Н. и др. Оценка иммунного статуса человека. – М., 1984. – 36 с.
6. Профилактика гнойно–септических осложнений при тяжелых ожогах с помощью иммуотропных лекарственных препаратов / С.Н. Пылаева, Н.А. Гординская, Л.М. Вазуна и др. // Журн. Микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2000. – № 1. — С. 72–75.
7. Расулов, Б.Х., Рискеев Б.Д., Мусаходжаева Д.А. Иммунокорректирующее действие УФОК при лечении ожоговой болезни на фоне сахарного диабета в период острой ожоговой токсемии // Мед. иммунология. 2005. – № 2–3. – С. 318–319.
8. Сибиряк, С.В., Юсупова Р.Ш., Курчатова Н.Н. Иммунофенотипирование лимфоцитов в клинической практике. – Уфа, 1997.– 22 с.
9. Якобисяк, М. Иммунология. – Нова книга, 2004. – 695 с.
10. Cytokine– induced nitric oxide synthase gene transcription is blocked by the heat shock response in human liver cells / M.E. de Vera, J.M. Wong, J.Y. Zhou et al // Surgeiy. 1996. – Vol. 120, № 2. – P. 144–149.
11. Effects of interleukin–6 (IL–6) and transforming growth factor–beta (TGF–beta) on neutrophil elastase release / U. Bank, D. Rainhold, D. Kunz et al // Inflammation. 1995. – Vol. 19, № 1. – P. 83–99.